

PHB 생산의 최적화 및 제어를 위한 이단유가식 배양의 전산모사

이재호¹ · 이용우² · 유영제^{1,2*}

¹서울대학교 협동과정 생물화학공학, ²서울대학교 공과대학 화학공학과

A Simulation Study of Two-stage Fed-batch Culture for Optimization and Control of PHB Production

Lee, Jae Ho¹, Yong Woo Lee² and Young Je Yoo^{1,2*}

¹Biochemical Engineering Program,

²Department of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — For the purpose of optimizing poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production from *Alcaligenes eutrophus*, two-stage fed-batch culture was adopted. In this system, specific growth rate was maximized during the first stage whereas specific production rate was maximized during the second stage. The optimal concentrations of glucose and ammonium chloride were 16.6 and 0.54 g/l in the growth stage and 20.0 and 0.07 g/l in the production stage, respectively. Proportional feedback control considering time lag was suggested for PHB production process and a simulator was developed for real-time control purpose.

환경문제의 대두와 더불어 많은 관심을 끌게 된 poly- β -hydroxybutyrate(PHB)는 범용 플라스틱인 폴리프로필렌과 유사한 물성을 가진 고분자 물질이다. PHB는 미생물에 의해 완전 분해되므로 유전공학에 의한 균주 개량, 발효공정의 최적화, 분리공정의 개선 등 생산기술이 향상된다면, 난분해성인 범용플라스틱을 대체할 수 있는 소재중의 하나이다.

PHB는 적절한 생분해성, 생체적합성, 압전성(piezoelectricity), 성형가공성, 자외선 안정성, 광학적 활성, 기체 차단성 등과 같은 많은 유용한 성질을 가지고 있다. 그리고 P(BH-co-HV)같은 공중합체를 이용하면 그 물성이 향상되는 것으로 알려져 있다. 최근 들어 의약 및 의료용, 식품포장용, 농업용, 화학물질의 전구체 등, 그 응용의 폭이 점차 확대되고 있다. PHB의 생산에 관한 연구는 상업화 과정과 함께 크게 진전되었다. 회분식 배양 및 연속배양에서의 PHB 생성 속도론에 대한 연구들이 1980년대에 들어와서 활발히

이루어졌다(1, 2). 이러한 배경하에서 PHB 생산공정을 제어하려는 노력들이 많아졌다. 특히 Suzuki 등(3-5)은 순수한 산소의 이용, 미네랄의 지속적 공급, C/N비를 변화시키는 기법을 유가식 배양에 적용하여 *Methylotroph*로부터 136 g/l의 PHB를 생산하였다. 이러한 발전에도 불구하고, PHB 생산공정의 전반적인 제어에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다. 이는 PHB가 세포내 축적물이므로 그 생성정도를 짧은 시간내에 정확히 파악하기 어렵고, 일반적으로 대량생산에 많이 이용되는 유가식 배양이 동적인 시스템이므로 해석이 어려우며, 제한기질로서 탄소원과 질소원(또는 인산염)을 동시에 고려해야하는 부담을 가지고 있기 때문이다. 특히 질소원의 경우 적절한 제어가 필요한데 이는 질소원이 거의 고갈될 무렵부터 PHB 생성속도가 급격히 커지게 되며, 완전히 고갈되는 것보다는 미량이나마 질소원이 존재할 때 생성속도가 증가하기 때문이다(6). 따라서 질소원의 생성에 최적인 질소원의 농도를 찾는 것은 PHB 생산공정에 있어서 중요한 요소가 된다. 그리고 성장과 생산에 있어서 각각의 최적조건을 고려해야하기 때문에 첫번째 단계에서는

Key words: *Alcaligenes eutrophus*, PHB, fed-batch culture, optimization, bioreactor control

*Corresponding author

성장을, 두번째 단계에서는 생산을 최대화하도록 발효액의 조건을 맞추어주는 이단유가식 배양(two-stage fed-batch culture)이 적절하다고 하겠다.

이러한 배경하에서 본 연구는 PHB의 생산성을 향상시키기 위한 반응시스템의 선정 및 제어전략을 수립하는데 주 목적을 두었다. 이 목적을 달성하기 위하여 PHB 생산에 최적인 탄소원 및 질소원의 농도를 결정하고, 이단유가식 배양을 구성하여 제어전략을 수립하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

Alcaligenes eutrophus NCIB 11599를 PHB 생산균주로 이용하였다. 배양에 사용된 배지조성은 Table 1에 나타내었다. 탄소원으로는 글루코스를 사용하였고, 질소원으로는 NH_4Cl 을 이용하였다. 미량원소들은 Siegel과 Ollis(2)의 조성대로 하였다. 유가식 배양에서 주입기질의 농도는 탄소원의 경우 300 g/l로 하였고, 질소원의 경우 30 g/l로 하였다. 주입기질내 다른 성분들은 고갈되지 않도록 회분식 배양의 경우보다 2배 정도 첨가하였다.

배양조건

접종을 위한 플라스크 배양은 회분식 배양과 동일한 배지를 사용하였고, 500 ml-Erlenmeyer 플라스크에서 200 ml의 배지에 접종하여 진탕배양기에서 150 rpm, 35°C의 조건으로 배양하였다.

회분식 배양은 5l 크기의 교반식 발효조(한국 발효기, Model SY-500)에서 수행하였고 초기 부피는 2l로 하였다. 교반속도는 400 rpm, 통기속도는 1.5 vvm, 온도는 35°C, pH는 6.8~7.0 사이로 조절하였다.

유가식 배양은 산소의 결핍을 방지하기 위해서 통기속도와 교반속도를 점차 증가시켰고, 나머지 조건은 회분식 조건과 동일하게 하였다. 탄소원과 질소원은 두개의 peristaltic pump를 이용하여 개별적으로 주입하였다.

분석방법

분광광도계(Kontron, UV-Spectrophotometer)를 사용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 보정곡선으로부터 전체세포의 농도를 결정하였다. PHB의 농도는 Ward와 Dawes(7)에 의해 제안된 disk assay법을 이용하였다. 글루코스농도의 분석은 DNS법

Table 1. Nutrient composition of medium

Medium	Chemical	Source	Concentration (g/l)
YM medium	yeast extract	Sigma	3.0
	malt extract	Difco	3.0
	tryptone	Difco	5.0
	glucose	Junsei	10.0
	MgSO_4	Junsei	0.1
	agar	Junsei	15.0
Batch culture (A)	glucose	Junsei	30.0
	MgSO_4	Junsei	0.1
	trace elements		0.0001
Batch culture (B)	NH_4Cl	Duksan	2.0
	KH_2PO_4	Junsei	2.5
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Junsei	5.0
	NaHCO_3	Duksan	1.0

(8)을 사용하였으며, 암모늄이온의 농도는 Berthelot 반응(9)을 이용하여 분석하였다.

제어 전략

최적의 기질 주입속도를 결정한 상태에서 실제 발효과정 중 여러가지 요인들—미량원소의 고갈, 발효액의 점도 변화로 인한 물질전달의 변동, 부산물의 생성 등—로 인하여 수율이 변한다거나 시간지연 현상이 일어날 수 있다. 따라서 목표치를 유지하려면 일정한 간격으로 시료를 채취하여 오차가 발생하면 이를 보정해주는 되먹임 제어계를 이용하여야 한다.

제어계로는 일반적으로 P, PI, PID 제어계를 이용하는 경우가 많다. Zigler-Nichols 계단응답법을 이용하여 제어매개변수인 비례이득상수(K_c), 적분시간상수(T_i), 미분시간상수(T_d)를 구하는 것이 보편적이다.

본 제어계의 경우 탄소원과 질소원이 서로 상호작용(interaction)이 있는 MIMO(Multi-Input Multi-Output)계이므로 PID 제어를 할 경우 이들 매개변수를 구하기가 매우 까다롭다. 따라서 본 연구에서는 매개변수 K_c 를 각 상황에 따라 변화시켜주는 간단한 비례제어를 PHB 생산에 이용하였다.

즉 모사기를 운전하면서 다음 시료채취 시간에서 제어변수인 탄소원과 질소원이 최적의 농도에 도달하는 정도를 파악하여 가장 적합한 값을 취하도록 하였다.

아래의 (1), (2)식은 본 제어계에서 이용된 비례 제어요소를 나타내준다.

$$\text{For } G : \frac{K_G'}{G_{opt}}(G - G_{opt}) \quad (1)$$

$$\text{for } N : \frac{K_N'}{N_{opt}}(N - N_{opt}) \quad (2)$$

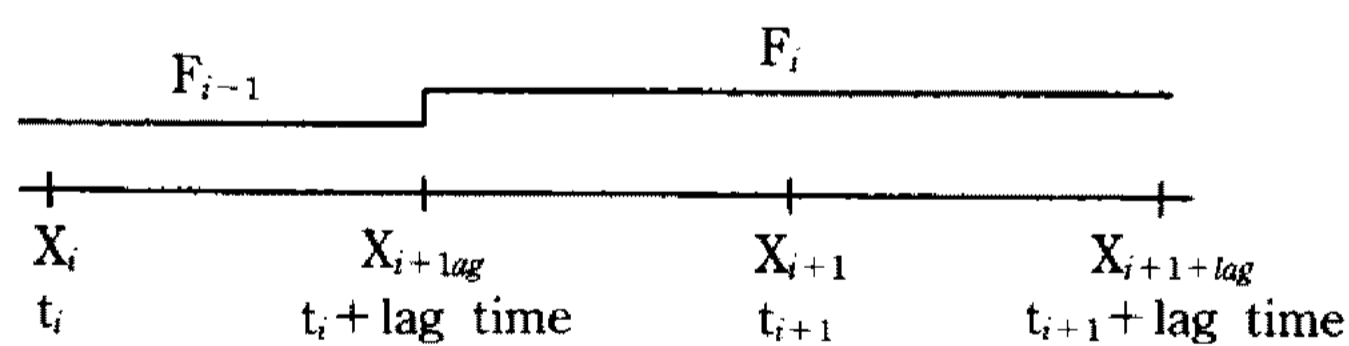
(1), (2)식을 (8), (9)식에 추가하면 아래와 같은 상태 변수 및 비례제어요소로 나타난 기질 주입속도식을 얻을 수 있다.

$$\begin{aligned} F_{G,B} &= \frac{RV(\Delta N_s Y_G - G_{X_s} Y_N)}{\Delta G_s \Delta N_s - G_{X_s} N_{X_s}} + \frac{K_G'}{G_{opt}}(G - G_{opt}) \\ &= F_{G,F} + \frac{K_G'}{G_{opt}}(G - G_{opt}) \end{aligned} \quad (3)$$

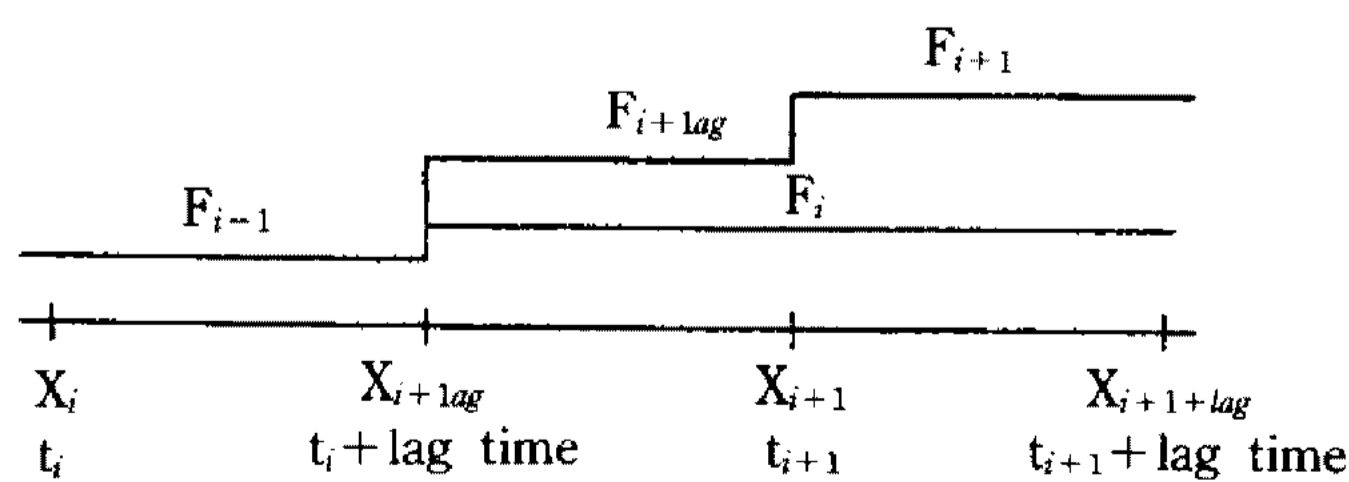
$$\begin{aligned} F_{N,B} &= \frac{RV(\Delta G_s Y_N - N_{X_s} Y_G)}{\Delta G_s \Delta N_s - G_{X_s} N_{X_s}} + \frac{K_N'}{N_{opt}}(N - N_{opt}) \\ &= F_{N,F} + \frac{K_N'}{N_{opt}}(N - N_{opt}) \end{aligned} \quad (4)$$

여기서 비례이득인 K_G' 와 K_N' 는 앞에서 언급한 것과 같이 제어변수의 추종성에 따라 변화하는 값이다.

각 상태변수들을 시간지연 없이 측정할 수만 있다면 위의 (3), (4)식만으로도 제어가 가능하겠지만, 측정에 있어서의 시간지연이 있을 경우에는 즉, on-line의 경우에는 센서의 시간지연이 있고 off-line에서는 분석시간이 필요한데 이를 고려하여야 한다. 본 실험에서는 글루코스과 암모늄의 농도분석에 있어서 화학적인 방법을 사용하였으므로, 세포의 분리 및 화학적 처리시간을 포함하여 최소 40분의 시간지연이



(a) Feedback control with time lag



(b) Predictive feedback control

Fig. 1. Comparison of schemes for determining optimal feed rate.

발생하였다. 본 연구에서는 모델식을 이용할 수 있기 때문에 Fig. 1과 같은 형태로 제어전략을 수립하였다. X_i , X_{i+1} 은 각 시료채취시간에서 상태변수를 나타내고 X_{i+lag} , $X_{i+1+lag}$ 는 t_i , t_{i+1} 에서 분석으로 인해 지연된 시간에서의 상태변수를 나타내준다. 실제로 X_i , X_{i+1} 은 일정한 시간지연이 있을 후에 그 값을 알게 된다.

결과 및 고찰

최적 암모늄농도

Heinzle과 Lafferty(1)는 *A. eutrophus*의 PHB 생성에 대하여 모델식을 제안하였는데 세포의 성장속도와 PHB의 생성속도를 제한기질인 암모늄 이온의 농도와 생체세포(residual mass) 및 PHB의 농도에 관한 함수로써 나타내었다. Asenjo와 Suk(10)은 *Methylophil*에 의한 PHB의 생합성 모델을 제안하였는데, 세포내 최대의 PHB 농도를 가정하고, 그 농도까지 PHB가 축적되면 PHB의 생합성이 정지되는 생성물 저해(product inhibition)와, 질소원에 의한 저해를 고려하였다.

Mulchandani 등(11)은 세포저해가 있는 세포성장 속도식과 세포농도에 비례하는 PHB 생성속도식을 제안하였는데 PHB는 정체기에만 생성된다고 보았다. Lee와 Yoo(12, 13)는 회분식 배양을 통해서 탄소원과 질소원, 두가지 제한기질을 고려한 PHB 생성속도식을 제안하였는데, 본 연구에서는 이 모델을 개선하여 최적화 전략에 이용하였다. 이 모델은 세포의 성장에 있어서 탄소원에 의한 기질저해와 PHB의 생성에 있어서 세포내 저장물질인 PHB는 그 축적한계를 가지며, 이로 인한 생성물 저해를 logistic 형태로 고려하였으며, 질소원에 의한 기질저해를 고려하였다. 이 모델의 비PHB생산속도식은 암모늄 농도가 완전히 고갈될 때 비PHB생산속도가 최대의 값을 갖도록 되어 있다. 그러나 최근들어 암모늄이 완전히 고갈될 때보다 낮은 암모늄농도에서 비생산속도가 더 높다는 것이 보고되었다(6).

따라서 본 연구에서는 PHB 생합성에 최적인 암모늄농도를 구하기 위하여, 유가식으로 배양한 결과로부터 낮은 범위의 암모늄농도(0.1 g/l 이하)에 대해 비생산속도(specific production rate)가 어떻게 변화하는가를 알아보았다. 비생산속도는 시간변화에 따른 PHB생산속도를 측정하여 평균세포농도를 나누어 구하였는데, 암모늄농도가 약 0.1 g/l 이상에서는 Lee와 Yoo(13)가 제안한 모델식이 실험결과를 잘 모사한다

고 보고, 그 이하에서는 실험을 통해 구한 값을 적용하여 암모늄농도 전 구간(0~2 g/l)에 대한 PHB의 비생산속도식을 변형하여 (5)식과 같이 개선된 비생산속도식을 제안하였다.

$$v = v_m \left(1 - \frac{(P/X)}{(P/X)_m} \right)^\alpha \left(\frac{G}{K_{PG} + G} \right) \left(\frac{N}{K_{NP} + N + N^2/K_{PI}} \right) \quad (5)$$

Fig. 2는 비생산속도를 암모늄농도에 대한 함수로서 나타낸 것이다. 식 (5)에서 α 는 Lee와 Yoo(13)가 제안한 값(0.89)으로 하였고, 매개변수 K_{NP} 와 K_{PI} 는 simplex법으로 구하였는데 각기 0.0045 및 1.1070이다. 이들의 PHB 생산성에 대한 민감도는 그리 크지 않았다.

*A. eutrophus*의 성장 및 PHB의 생산에 있어서 최적의 기질농도에 대한 연구는 미비한 실정이다. 다만 PHB 생산에 있어서 제한인자인 질소원이 완전히 고갈될 때보다는 매우 낮은 농도가 더 효과적이라고 Bitar와 Underhill(6)이 실험으로 입증하였다. 한편 Tal 등(14)은 *Azospirillum brasilense*의 추출물로부터 PHB 합성기작에 관련된 효소들을 분석하였는데 제한인자인 NH_4Cl 양에 따른 hydroxybutyrate dehydrogenase, β -ketothiolase, thiophorase, acetoacetyl-CoA 등의 효소활성을 고찰하여 NH_4Cl 이 완전히 고갈되었을 때보다 2.8 mM(0.13 g/l)일 때 더 높은 활성을 보임을 보고하였다.

2변수-2단계 유가식 배양

본 연구에서는 여러가지 유가식 배양 형태 가운데 직접 되먹임 제어(feedback control)를 이용한 유가식 배양을 채택하였다. 사용한 제어변수는 탄소원인 글루코스의 농도와 질소원인 암모늄의 농도이다. 성장 단계와 생산단계를 나누어 서로 다른 조건으로 생산하는 이단 유가식 배양을 채택하였는데, 그 이유는 *A. eutrophus*의 성장과 PHB 생합성에 있어서 최적 기질농도가 서로 다르기 때문이다. 그리고 탄소원과 질소원 두가지를 제한기질로 사용하므로, 성장과 생산에 있어 각각의 최적농도를 구해 단계별로 배양액의 상태를 최적조건으로 유지시켜주는 방식을 이용하였다. 여기서 사용된 이단 유가식 배양의 구성을 Fig. 3에 나타내었다.

본 연구에서는 회분식 배양속도식, 유가식 배양 실험, 모사 등을 통하여 탄소원과 질소원의 최적 농

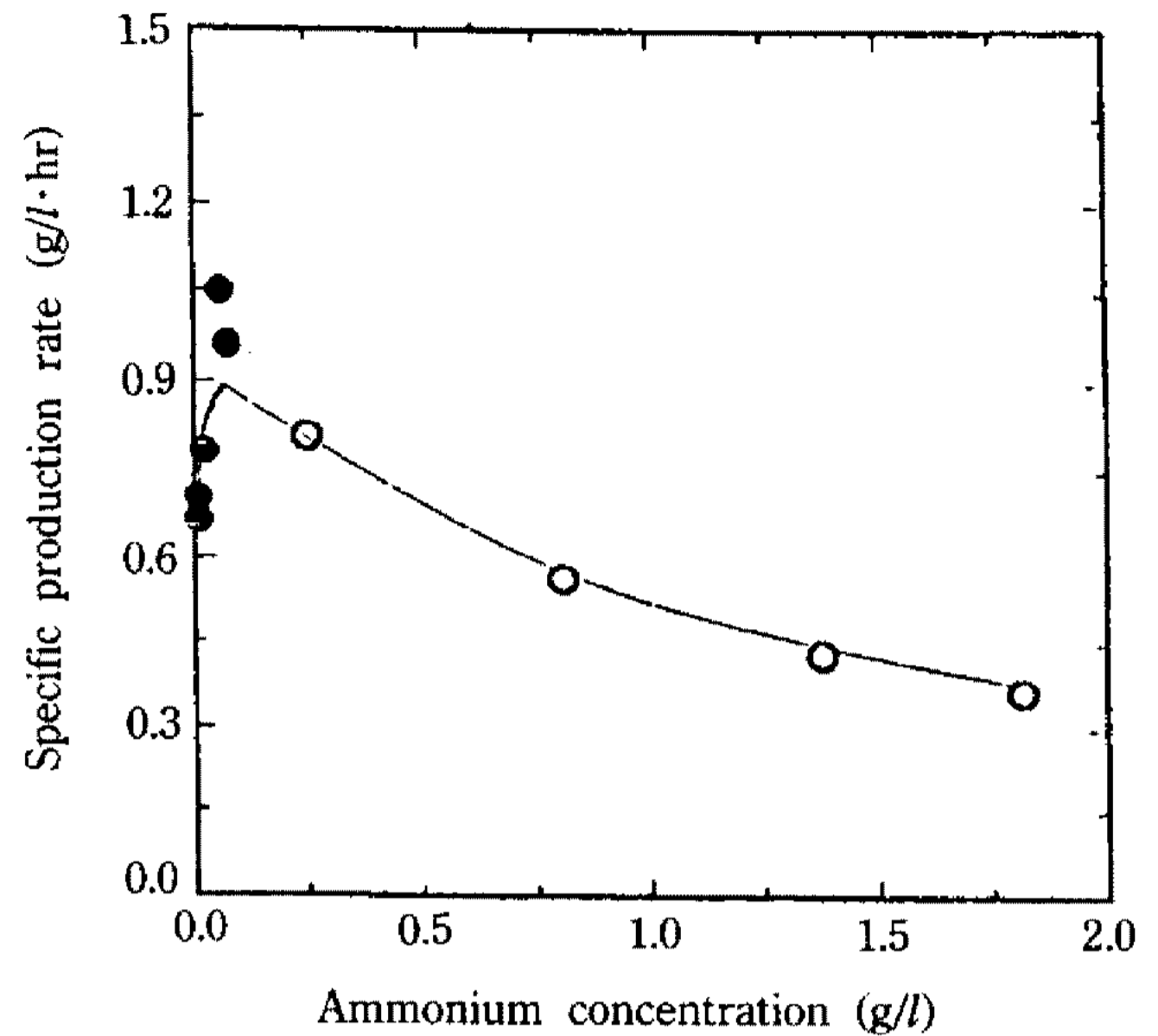


Fig. 2. Specific production rate of PHB (●, experimental; ○, kinetic data in literature; —, estimated using proposed model).

도를 결정하였다. 이때 최적 농도란 세포성장 단계(1단계)에서는 비성장속도를, 생산단계(2단계)에서는 비생산속도를 최대화하는 기질의 농도를 의미한다. 1단계에서 탄소원의 최적농도는 회분식 배양속도식에서 주어지고, 질소원의 경우 최대 성장속도의 90%에 해당하는 속도를 나타내는 농도로 정하였다. 2단계에서 질소원의 최적농도는 유가식 배양실험을 통하여 비생산속도가 최대화되는 농도로 결정하였다 (Fig. 2). 한편, 탄소원의 최적 농도는 (5)식에서 보는 바와 같이 속도식이 Monod 형태이므로 속도식으로부터 직접 구할 수 없었기 때문에 모사를 통하여 결정하였다. 여기서는 탄소원과 질소원의 초기 농도, 접종량, 주입기질의 농도, 운전 가능한 최대 부피를 고정한 후, 모사를 통하여 최대의 생산성을 나타내는 농도를 최적의 농도로 결정하였다. 이때 최적의 전환시간도 함께 결정되었다. 모사의 조건은 Table 2와 같다. Fig. 4는 2단계에서의 최적 탄소원농도를 10 g/l에서 50 g/l까지 변화시키면서 아래와 같은 목적함수를 최대화하는 전환시간을 나타낸 것이다.

$$\text{Objective function} = \frac{P_{max}}{t_f} \quad (6)$$

이때 t_f 는 최종시간을 나타내며, P_{max} 는 t_f 에서의 PHB 농도를 의미한다. Fig. 4에서와 같이 모사를 통해서 결정된 생산에 최적인 글루코스 농도는 20 g/l인 것으로 나타났으며 이때 최적 전환시간은 26시간으로

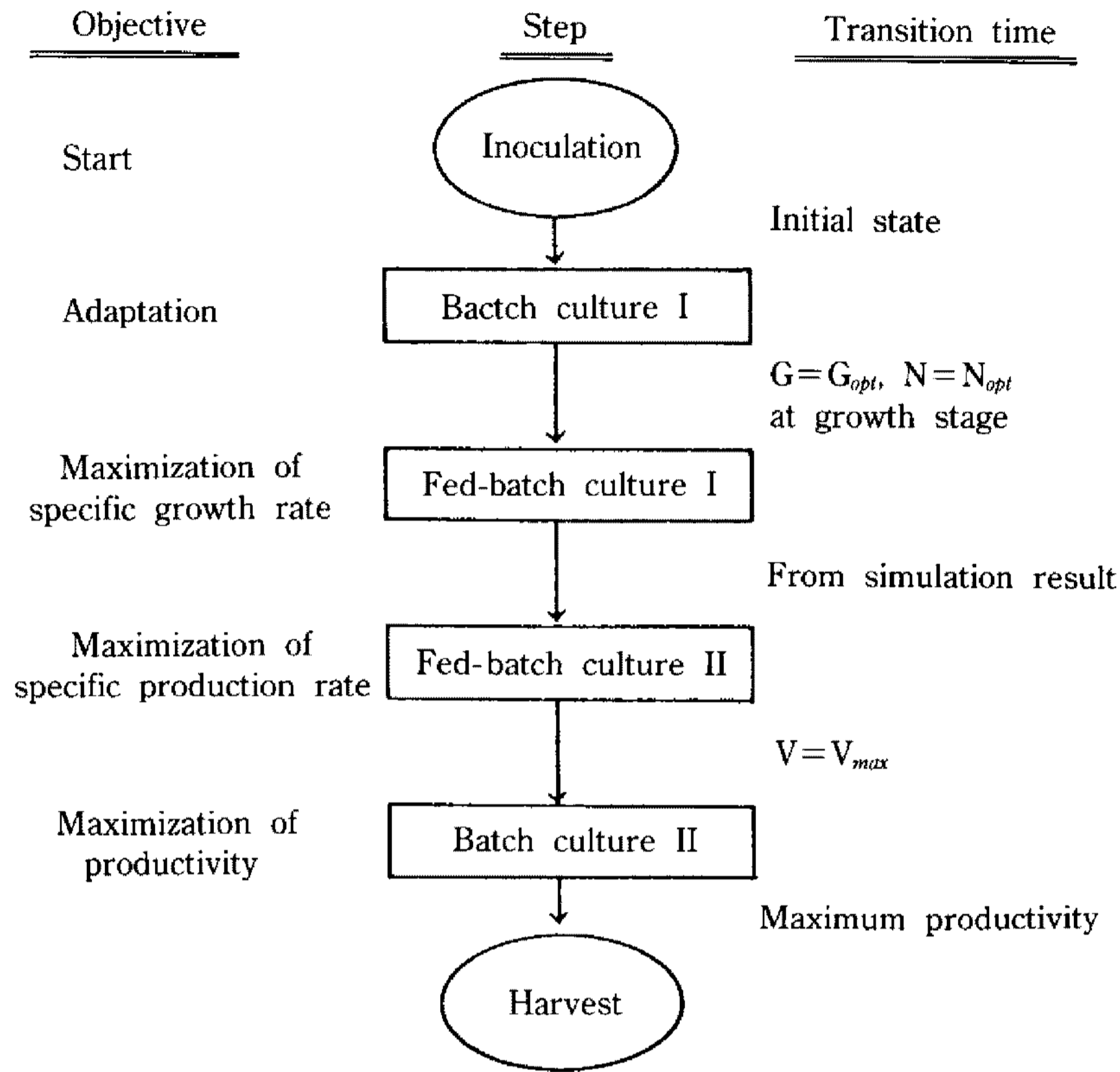


Fig. 3. The scheme of two-stage fed-batch culture.

Table 2. Simulation conditions for determining optimal transition time and glucose concentration in PHB production stage

Simulation parameter	Condition
Initial cell mass	0.2 g/l (dry weight)
V_{max}	4 l
Glucose concentration in feed	300 g/l
Ammonium chloride concentration in feed	30 g/l
Optimal glucose concentration in growth stage	16.64 g/l
Optimal ammonium concentration in growth stage	0.54 g/l
Optimal ammonium concentration in production stage	0.07 g/l
Maximum feed rate	0.2 l/hr

나타났다. 이를 정리하면 다음과 같다.

$$\text{First stage : } G_{opt} = (K_G K_{IG})^{1/2} = 16.64 \text{ g/l}$$

$$N_{opt} = 9 \times K_N = 0.54 \text{ g/l}$$

$$\text{Second stage : } G_{opt} = 20 \text{ g/l (from simulations)}$$

$$N_{opt} = 0.07 \text{ g/l (from experiments)}$$

탄소원 및 질소원의 최적 농도를 각각 G_{opt} , N_{opt} 라 할 때, 각 기질을 최적의 농도로 유지시키면

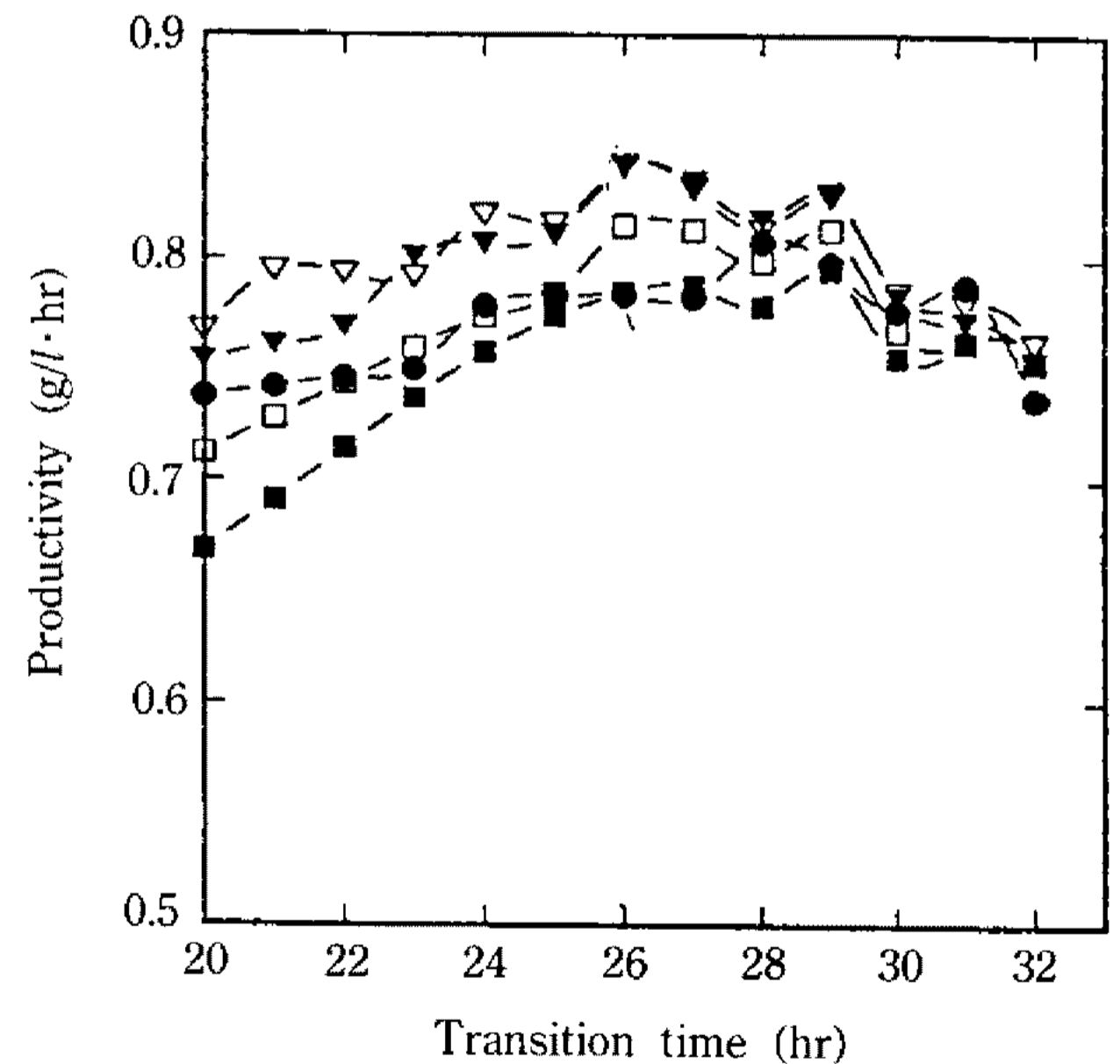


Fig. 4. Simulation results for the determination of optimal transition time and optimal glucose concentration in production stage (●, $G=10 \text{ g/l}$; ▽, $G=20 \text{ g/l}$; ▼, $G=30 \text{ g/l}$; □, $G=40 \text{ g/l}$; ■, $G=50 \text{ g/l}$).

$$\left. \frac{dG}{dt} \right|_{\text{at } G = G_{opt}} = 0 \quad \left. \frac{dN}{dt} \right|_{\text{at } N = N_{opt}} = 0 \quad (7)$$

가 되고 이때 최적의 기질 주입속도 $F_{G,F}$ 와 $F_{N,F}$ 는 서로 연립되어 (7)식을 물질수지식에 대입한 후, 연립방정

식을 풀면 아래와 같이 각 상태변수에 관한 함수로 표현된다.

$$F_{G,F} = \frac{RV(\Delta N_s Y_G - G_{X_s} Y_N)}{\Delta G_s \Delta N_s - G_{X_s} N_{X_s}} \quad (8)$$

$$F_{N,F} = \frac{RV(\Delta G_s Y_N - N_{X_s} Y_G)}{\Delta G_s \Delta N_s - G_{X_s} N_{X_s}} \quad (9)$$

이때

$$G_{X_s} = R/Y_{R/G} + P/Y_{P/G} - G_{opt}$$

$$N_{X_s} = R/Y_{R/N} - N_{opt}$$

$$\Delta G_s = G_f + G_{X_s}$$

$$\Delta N_s = N_f + N_{X_s}$$

여기서 구한 기질주입속도는 발효기간 동안 최적의 농도가 항상 유지될 때에 적용되는 것이다. 그런데 상태변수의 측정오차나 기질주입속도상의 오차로 인하여 최적의 농도가 유지되지 않을 때는 (8), (9)식을 그대로 적용할 수가 없고 되먹임 제어를 하여야 한다.

성장단계에서 생합성 단계로 전환할 때는 최적의 기질농도가 변화하므로 정상상태를 가정한 기질주입 속도로는 빠른 시간내에 목표치에 이를 수 없다. 따라서 비정상상태에서의 기질주입속도를 물질수지식으로부터 유도하여 단계 전환 초기에, 즉 목적치와의 상대오차가 5% 이내에 도달할 때까지 적용하였다.

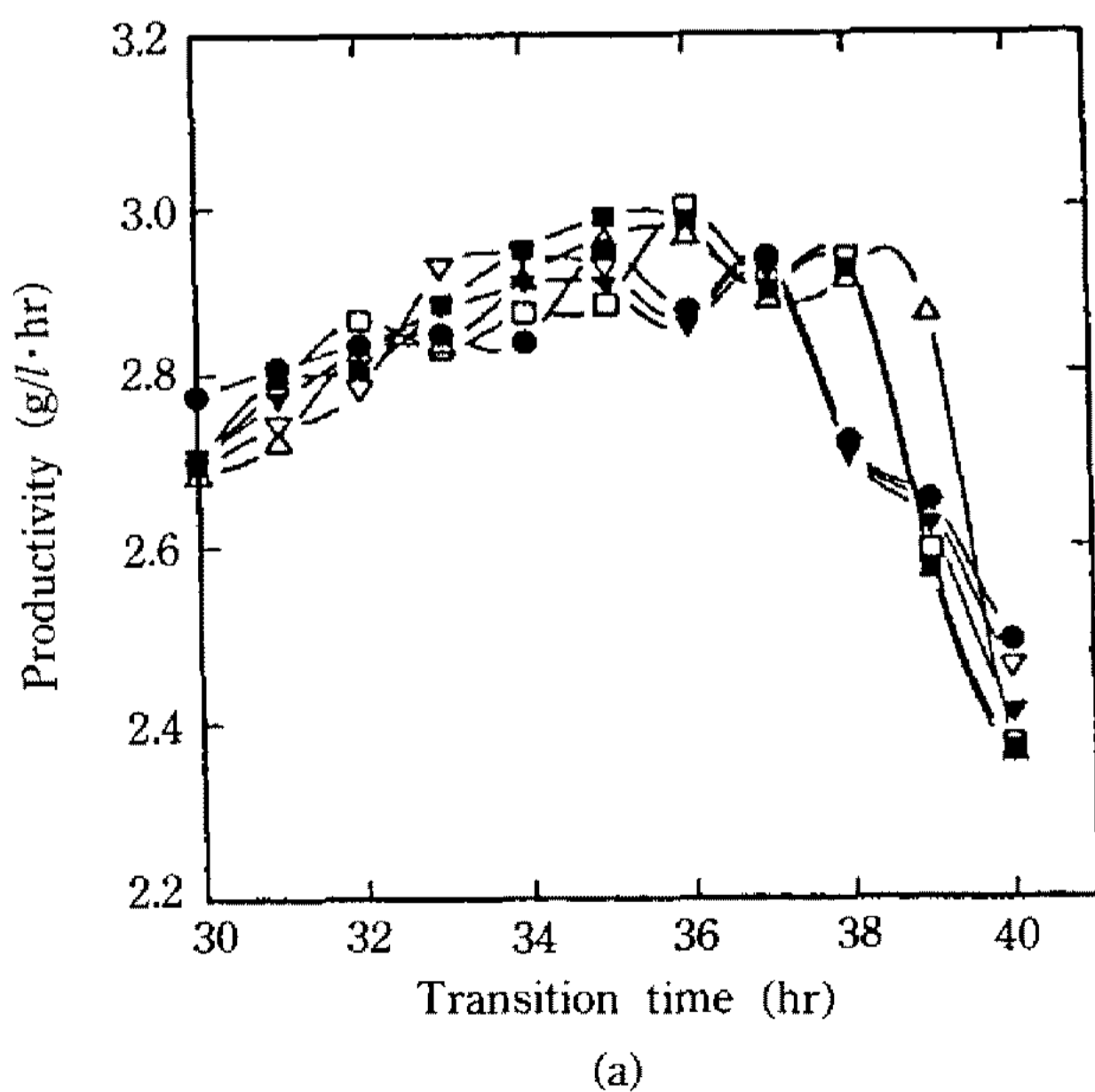
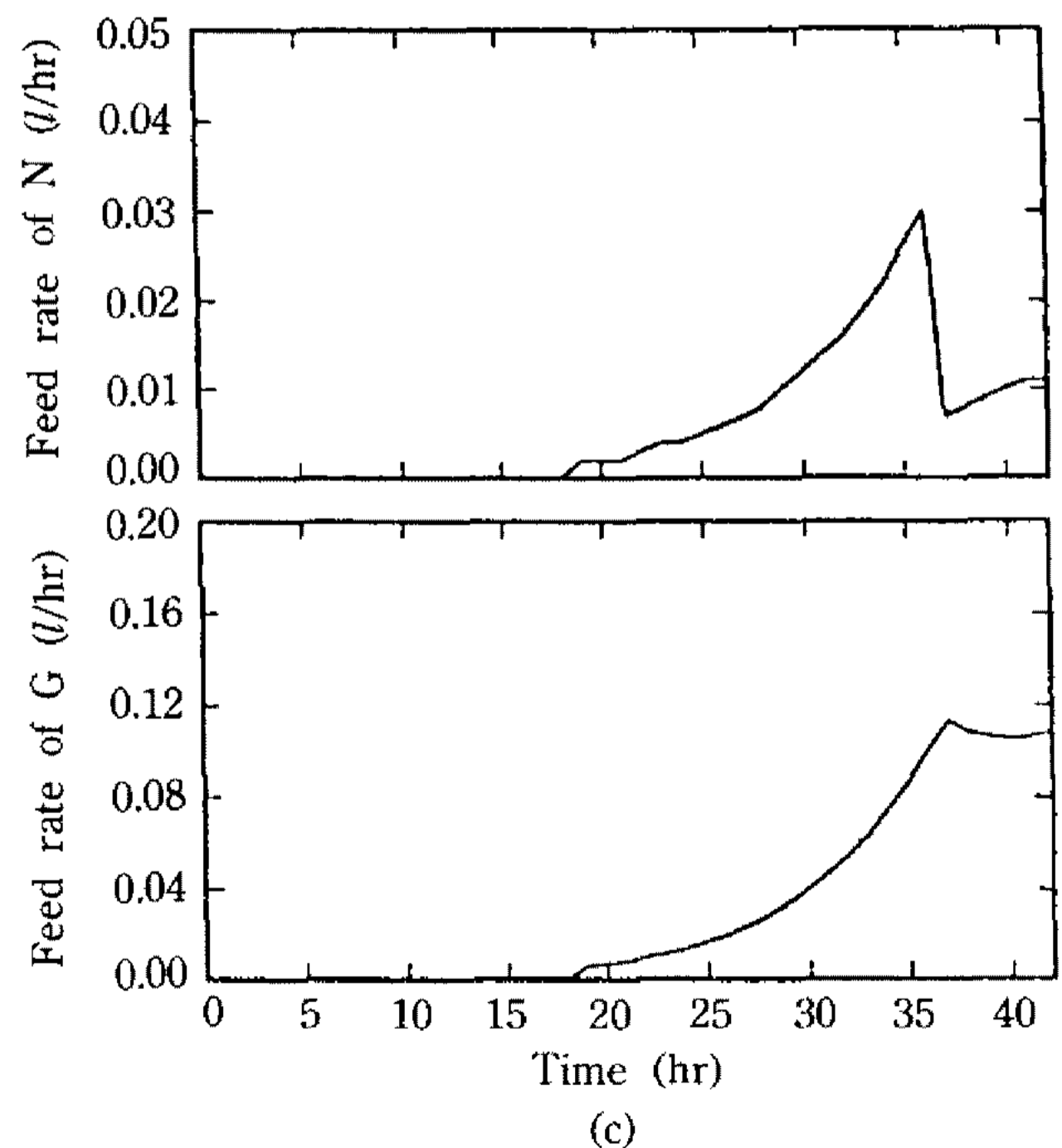
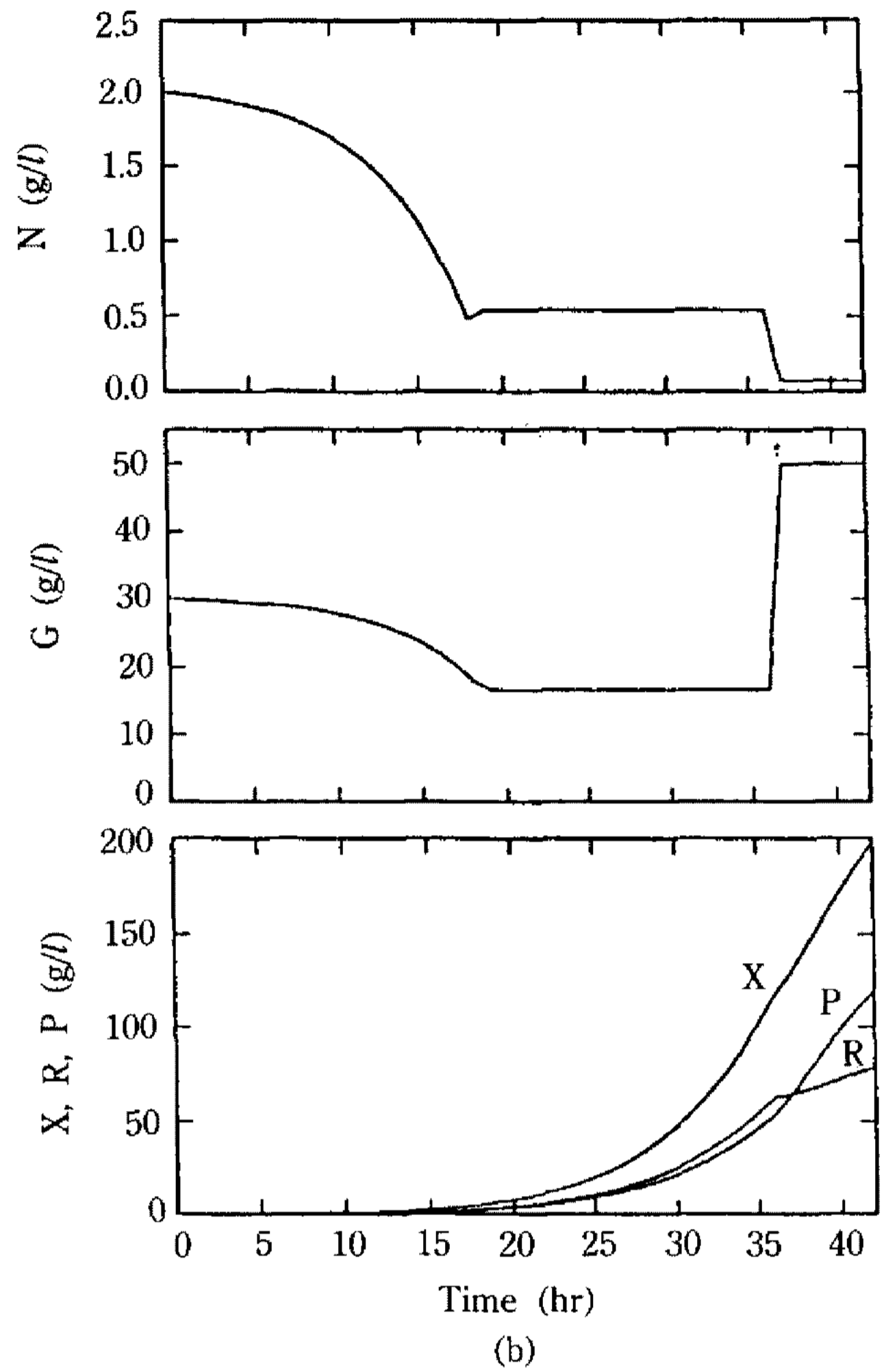


Fig. 5. Ideal case of the fermentation with glucose and ammonium chloride concentrations of 1000 g/l and 400 g/l, respectively.

(a) optimal transition time and glucose concentration in production stage (●, $G=35$ g/l; ▽, $G=40$ g/l; ▼, $G=45$ g/l; □, $G=50$ g/l; ■, $G=55$ g/l; △, $G=60$ g/l), (b) concentration profile of the state variables, (c) optimal feed rate.

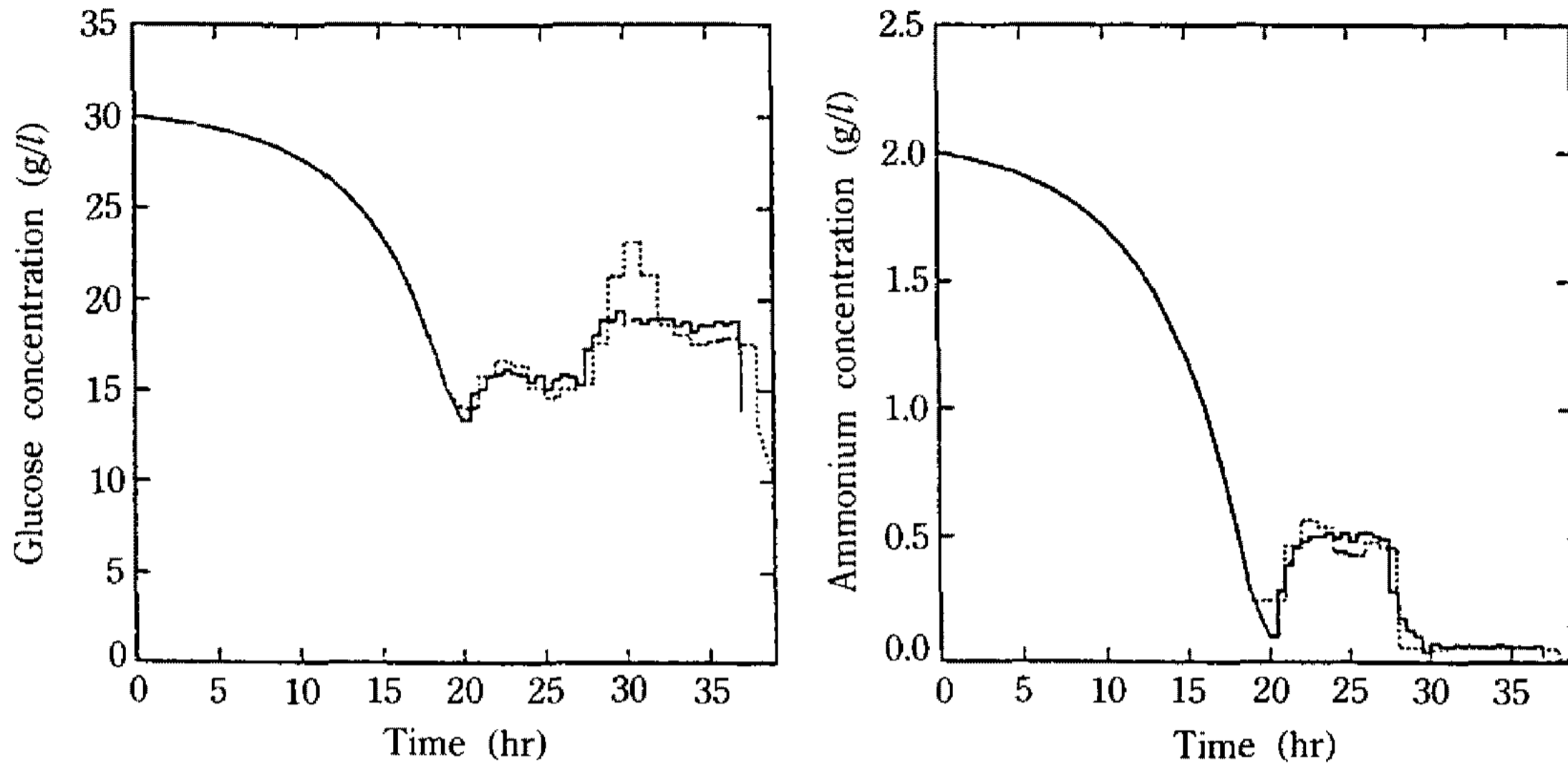


Fig. 6. Comparison between feedback control with time lag and predictive feedback control. (a) time course of glucose concentration, (b) time course of ammonium concentration (···, feedback control with time lag; —, predictive feedback control).

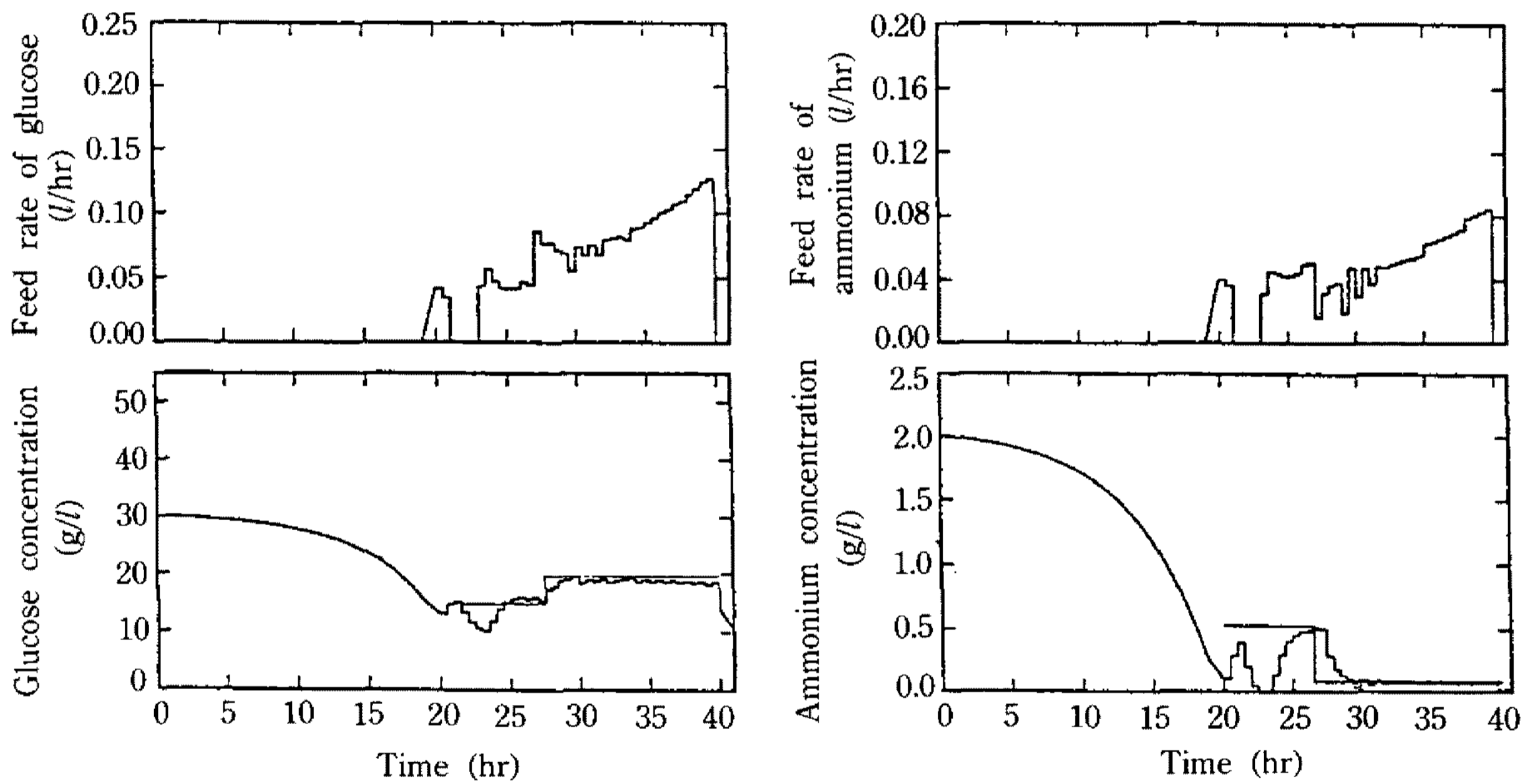


Fig. 7. Tracking performance in predictive feedback control. (a) time courses of glucose concentration and its feed rate, (b) time courses of ammonium concentration and its feed rate.

(10), (11)식은 글루코스과 암모늄의 주입속도에 대해서 나타낸 것으로 물질수지식으로부터 유도되었다.

$$F_G = \frac{RV(\Delta NY_G - G_X Y_N)}{\Delta G \Delta N - G_X N_X} + \frac{V\{(dG/dt)\Delta N - G_X(dN/dt)\}}{\Delta G \Delta N - G_X N_X} \quad (10)$$

$$F_N = \frac{RV(\Delta G Y_N - N_X Y_G)}{\Delta G \Delta N - G_X N_X}$$

$$+ \frac{V\{(dN/dt)\Delta G - N_X(dG/dt)\}}{\Delta G \Delta N - G_X N_X} \quad (11)$$

이때

$$G_X = R/Y_{R/G} + P/Y_{P/G} - G$$

$$N_X = R/Y_{R/N} - N$$

$$\Delta G = G_f + G_X$$

$$\Delta N = N_f + N_X$$

앞에서 유도된 기질주입속도식을 이용하여 유가식

배양을 할 때 이상적으로 얻을 수 있는 최대의 PHB 양을 알아보기 위해, 각 기질의 최대 용해한도(글루코스의 경우 1000 g/l, 암모늄의 경우 400 g/l로 정하였음)를 주입기질의 농도로 하여 모사를 실행해 보았다. Fig. 5는 이 경우에 있어서 최적의 전환시간, 시간에 따른 상태변수들의 농도와 기질주입속도를 나타내준다. 전환시간이 36시간일 때 최대의 생산성을 나타냈고 이 전환시간에서 암모늄농도는 급격히 감소하였지만 포도당농도는 급격히 증가하였다. 세포농도와 PHB 농도는 계속 증가하였다.

기질농도 제어

앞에서 유도된 식을 실제 발효공정에 이용하기 위해서 추종성능을 모사를 통해서 검토해 보았다. 우선 예측제어의 실효성을 알아보기 위하여 두가지 전략, 즉 시간지연을 고려하지 않은 되먹임제어와 시간지연을 고려한 예측되먹임제어를 서로 비교하여 보았다. Fig. 6에서 실선이 시간지연을 고려한 것이고 점선이 고려하지 않은 것인데 이것으로부터 예측제어에 의한 되먹임제어가 기질의 농도를 안정적으로 유지할 수 있어 보다 효과적임을 알 수 있었다. 다음으로 글루코스과 암모늄농도에 있어서 최대 5% 이내의 임의의 변동(random noise)을 주고, 특정시간에 기질의 주입을 중단하여 외란을 주었을 때, 예측 되먹임제어의 추종성능을 알아보았다. Fig. 7은 21시간부터 22시간 사이에서 외란을 주었을 때의 추종성능을 나타낸 것이다. 이때 비례이득은 편의상 일정한 값으로 고정(성장단계와 생합성단계 모두 $K_G'=0.1$, $K_N'=0.05$)시켰는데, 그 결과 추정성능은 좋은 것으로 나타났다.

요 약

*Alcaligenes eutrophus*에 의한 poly-β-hydroxybutyrate(PHB) 생산을 최적화하기 위해서 1단계에서는 성장을 최대화하고, 2단계에서는 생산을 최대화하는 이단 유가식 배양을 채택하였다. 성장단계에서 탄소원과 질소원의 최적농도는 회분식 배양 모델로부터 결정되었는데, 각기 16.64 g/l와 0.54 g/l이었다. 생산 단계에서 질소원의 경우, 유가식 배양실험을 통해 0.07 g/l가 최적인 것으로 나타났다. 탄소원의 최적농도는 모사로부터 결정되었고 이때 최적 전환시간도 함께 결정되었다. 생산공정의 제어를 위하여 시간지연을 고려한 적응비례 되먹임제어를 이용한 결과, 탄소원 농도 및 질소원농도를 최적의 상태로 유지시킬 수

있었다.

부 록

아래의 식들은 유가식 배양에 대한 물질수지식을 나타낸 것이다.

$$\frac{dR}{dt} = R\left(\mu - \frac{F}{V}\right) \tag{A1}$$

$$\frac{dP}{dt} = vR - P\frac{F}{V} \tag{A2}$$

$$\begin{aligned} \frac{dG}{dt} = & -Y_G R + G_f \frac{F_G}{V} \\ & + \left(\frac{R}{Y_{R/G}} + \frac{P}{Y_{P/G}} - G\right) \frac{F}{V} \end{aligned} \tag{A3}$$

$$\frac{dN}{dt} = -Y_N R + N_f \frac{F_N}{V} + \left(\frac{R}{Y_{R/N}} - N\right) \frac{F}{V} \tag{A4}$$

$$\frac{dV}{dt} = F_G + F_N \tag{A5}$$

여기서 μ , v , Y_G , Y_N 은 아래와 같다.

$$\mu = \mu_m \left(\frac{G}{K_G + G + G^2/K_{GI}} \right) \left(\frac{N}{K_N + N} \right) \tag{A6}$$

$$\begin{aligned} v = v_m \left(1 - \frac{P/X}{(P/X)_m} \right)^n & \left(\frac{G}{K_{PG} + G} \right) \\ & \left(\frac{N}{K_{NP} + N + N^2/K_{PI}} \right) \end{aligned} \tag{A7}$$

$$Y_G = \frac{\mu}{Y_{R/G}} + \frac{v}{Y_{P/G}} + m \tag{A8}$$

$$Y_N = \frac{\mu}{Y_{R/N}} \tag{A9}$$

사용기호

- F : Feed rate(l/hr)
- G : Glucose concentration(g/l)
- G_f : Glucose concentration in feed(g/l)
- G_{opt} : Optimal glucose concentration(g/l)
- K_c, K_G', K_N' : Proportional gain
- K_G, K_{IG}, K_N : Kinetic parameters in specific growth rate(g/l)
- K_{NP}, K_{PI}, K_{PG} : Kinetic parameters in specific pro-

	duction rate(g/l)
K_{GI}	: Inhibition constant for glucose in residual biomass growth rate(g/l)
K_I	: Inhibition constant for NH_4Cl in Eq. (1)
m	: Maintenance energy(hr^{-1})
N	: NH_4Cl concentration(g/l)
N_f	: NH_4Cl concentration in feed(g/l)
N_{opt}	: Optimal NH_4Cl concentration(g/l)
P, P_{max}	: PHB concentration(g/l)
$(P/X)_m$: Maximum PHB content(g PHB/g cell)
R	: Residual biomass concentration(g/l)
V	: Fermenter volume(l)
X	: Cell mass concentration(g/l)
t	: Time(hr)
t_f	: Final time(hr)
$Y_{P/G}$: PHB yield based on glucose(g/g)
$Y_{R/G}$: Residual biomass yield based on glucose(g/g)
$Y_{R/N}$: Residual biomass yield based on NH_4Cl (g/g)

Greek Letters

α	: Exponent in specific PHB production rate
μ	: Specific growth rate of residual biomass(hr^{-1})
μ_m	: Maximum specific growth rate of residual biomass(hr^{-1})
v	: Specific PHB production rate(hr^{-1})
v_m	: Maximum specific PHB production rate(hr^{-1})

참고문헌

- Heinzle, E. and R.M. Lafferty. 1980. A kinetic model for growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid(PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 8-16.
- Siegel, R.S. and D.F. Ollis. 1984. Kinetics of hydrogen-oxidizing bacterium *Alcaligenes eutrophus* (ATCC 17707) in chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 764-770.
- Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu. 1986. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of *Methylotheroph.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-329.
- Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu. 1986. Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 366-369.
- Suzuki, T., T. Yamane and S. Shimizu. 1986. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 370-374.
- Bitar, A. and S. Underhill. 1990. Effect of ammonium supplementation on production of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in batch culture. *Biotechnol. Lett.* **12**: 563-568.
- Ward, A.C. and E.A. Dawes. 1973. A disk assay for poly- β -hydroxybutyrate. *Anal. Biochem.* **52**: 607-613.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Srienc, F., B. Arnold and J.E. Bailey. 1984. Characterization of intracellular accumulation of poly- β -hydroxybutyrate(PHB) in individual cells of *Alcaligenes eutrophus* H16 by flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 982-987.
- Asenjo, J.A. and J.S. Suk. 1985. Kinetics and models for the bioconversion of methane into an intracellular polymer, poly- β -hydroxybutyrate (PHB). *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. **15**: 225-234.
- Mulchandani, A., J.H.T. Luong and A. Leduy. 1988. Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 639-646.
- Lee, Y.W. and Y.J. Yoo. 1990. Effect of glucose and ammonium concentrations on cell growth and poly- β -hydroxybutyrate(PHB) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 607-612.
- Lee, Y.W. and Y.J. Yoo. 1991. Kinetics for the growth of *Alcaligenes eutrophus* and the biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 186-192.
- Tal, S., P. Smirnoff and Y. Okon. 1990. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1191-1196.
- Choi, J.H., J.H. Kim, M. Daniel and J.M. Lebeault. 1989. Optimization of growth medium and poly- β -hydroxybutyric acid production from methanol in *Methylobacterium organophilum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 392-396.
- Lee, H.J., J.S. Park and Y.H. Lee. 1991. Copolymer of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate produced by *Methylobacterium* sp. GL-10. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 94-99.

(Received September 30, 1992)